

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

細胞-基材界面の蛍光観察に特化した
温度応答性高分子超薄膜に関する研究

Ultra-thin temperature-responsive polymer layer
for bioimaging

申 請 者

福守	一浩
Kazuhiro	Fukumori

応用化学専攻 化学工学研究

2 0 1 0 年 4 月

温度応答性高分子として知られる poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm)を電子線重合法により固定化した温度応答性培養皿は 32°C を境に培養皿表面が高温側で疎水性、低温側で親水性に変化する。この性質を利用することで温度変化により培養皿表面上で細胞の接着・脱着を制御することができる。さらに、本表面を利用することでコンフルエント状態まで培養した細胞をシート状で回収することが可能である。近年の報告では、これら細胞の接着・脱着現象はポリスチレン製組織培養皿(Tissue-Culture-Polystyrene: TCPS)上に固定化されたポリマー層の厚みが約 15 nm の超薄膜の場合にのみ観察され、その厚みが約 30 nm 程度まで厚くなると細胞の接着性が著しく低下することが明らかになっている。この違いは、疎水性基材である TCPS によるグラフト PIPAAm 鎖に対する脱水和の促進が寄与している。すなわち、膜厚が薄い 15 nm の PIPAAm 固定化表面はより疎水性を示すが、これよりも厚い 30 nm では 15 nm のときのそれよりも水和していると考えられ、超薄膜の固定化ゲルの物性は基材表面物性の影響を受けることが推察される。一般的に、細胞接着、増殖、生理的機能は材料の表面物性により影響を受けることが知られている。これは材料表面に吸着した細胞外マトリックス(Extra Cellular Matrix: ECM)等のタンパク質とインテグリン等の細胞膜表層の ECM 受容体が結合すると、インテグリンのクラスターリングや受容体からの接着による細胞内シグナルの伝達(受容体活性化によるシグナル伝達など)によって引き起こされる。従って、材料表面でのタンパク質吸着および細胞接着現象を捕らえる事は、細胞接着によって引き起こされる細胞機能変化の解析、解明において極めて重要である。

本研究では、界面近傍のみを高感度に観察できる全反射型蛍光顕微鏡(Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: TIRFM)に着目し、TIRFM による細胞接・脱着時の測定が可能な温度応答性ガラス表面の作製と、その表面物性が培養細胞にあたえる影響についての検討を行った。

本論文は、以下の 4 章より構成される。

第 1 章は、温度応答性高分子ゲルの特性とそれを固定化した表面の応用を既往研究から振り返り、温度応答性表面と培養細胞との相互作用について現状で未解明な点を明らかにした。次いで、本論文の目的と意義を議論した。

第 2 章では、電子線重合法により種々のモノマー濃度で温度応答性高分子をガラス表面に固定化し、その表面特性が培養細胞の接・脱着に与える影響を検討した。X 線光電子分光法により C, O, N, Si の元素組成比を測定したところ、作製した温度応答性表面の元素組成比はモノマーの構造から計算される理論値と精度よく一致し、ガラス表面上に PIPAAm が固定化されたことが確認された。次にガラス表面上に固定化した PIPAAm 量を、ATR/FT-IR を用いて定量したところ、仕込

みモノマー濃度の増加に従いゆるやかな増加傾向を示し、5 から 50 wt%仕込みのモノマー濃度にたいして、それぞれ 0.84 から 1.49 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の値となった。また固定化されたポリマー膜厚を測定するため、ポリマー層を UV エキシマレーザーで部分蒸散させその断面を原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy: AFM) で観察した。その結果、仕込みモノマー濃度の増加に従いポリマー膜厚は 3.5 から 9.6 nm の範囲で増加することが確認された。この結果より、仕込みモノマー濃度を変化させることで、PIPAAm 固定化層の厚みをナノメートルオーダーで制御できることを確認した。ついで、これらの表面の 20°C および 37°C での水に対する濡れ性を静的接触角法により評価した。その結果、すべての PIPAAm 固定化ガラス表面で、高温側では疎水性を示し、低温側では親水性を示す温度応答性の表面であることが確認された。また、モノマー濃度の増加にともない表面がより親水性に変化した。これは、ポリマーの厚みが増加することで、ポリマー表層部の高分子鎖の分子運動性に対する基材物性による抑制が小さくなるため、その結果、高分子鎖の水和が促進され、親水的な表面になったためと考えられる。

続いて、作製した PIPAAm 固定化ガラスの細胞接着性および脱着についてウシ頸動脈由来内皮細胞を用いて評価を行った。その結果、ポリマー膜厚の一番薄い 3.5 nm の表面が最も接着性が高く、膜厚の増加にともない細胞の接着性が低下した。また、膜厚 7.4 nm 以上の PIPAAm 固定化表面では細胞が接着しなかった。この結果は、ポリマー膜厚の増加にともなう表面の親水性化の結果と傾向が一致している。つまり、水中(培地中)の PIPAAm 固定化層は相転移温度以上(37°C)でも脱水和しているが、固定化層の厚みが増加するに従い高分子鎖の水和が促進し、細胞接着を抑制する表面となった。また、低温処理により PIPAAm を固定化したガラス表面から 1 時間以内にほぼ全ての細胞が脱着した。

これらの結果から、温度変化により培養細胞の接・脱着の制御が可能な温度応答性表面を作製するためには、4 nm 以下の超薄膜 PIPAAm 層を構築することが必要であることが明らかになった。

第 3 章では、温度応答性高分子薄膜表面の水和状態の解析と細胞接着タンパクの吸着挙動について検討を行った。乾燥時において 3.3 および 8.8 nm の 2 種類のポリマー膜厚の PIPAAm 固定化表面に UV エキシマレーザーを照射し、微細加工を行った。次に AFM を用いて 25°C および 37°C の条件で微細加工部位の水中測定を行った。その結果、ポリマー膜厚 3.3 nm の表面は 6.0 nm(37°C)から 8.0 nm(20°C)と温度変化にともないポリマー層が膨潤したのにたいして、膜厚 8.8 nm の表面では、12.9 nm(37°C)から 25.4 nm(20°C)とより大きな厚みの変化が観察された。また 37°C において微小領域(3 × 3 μm)の表面形状を測定したところ、PIPAAm 表面の脱水和によるマッシュルーム状の凝集が確認され、その大きさは膜厚 3.3 nm の表面で 50 nm 程度だったのに対し、膜厚 8.8 nm の表面では 100 nm

程度だったことから、膜厚の薄い表面でより脱水和が促進されていることが確認された。次に細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンを、上記の2種類の表面に37°Cで24時間反応させその吸着量を定量したところ、それぞれ膜厚3.3 nmの表面で330 ng/cm² (膜厚3.3 nm)と膜厚8.8 nmの表面で130 ng/cm²と大きく異なる値を示した。また、フィブロネクチン吸着後の表面をAFMで測定した結果、その吸着の形態に差が見られた。膜厚3.3 nmの表面では繊維状の凝集が見られたのに対し、膜厚8.8 nmの表面では球状あるいは環状の形態が見られた。これらの結果から、37°Cにおいて膜厚8.8 nmの表面は膜厚3.3 nmの表面と比較して水和が促進されており、細胞接着タンパクとの相互作用が弱いことが確認された。そのため、相転移温度以上の37°Cにおいても膜厚8.8 nmの表面は細胞非接着性を示すと考えられる。さらに、表面に吸着したフィブロネクチンの吸着形状も異なったことから、RDG部位などのモチーフが隠れた立体構造になっている可能性が示唆された。

第4章は、温度応答性高分子表面から低温処理により剥離する培養細胞の膜タンパクの挙動をTIRFMにより測定し、タンパク質分解酵素であるトリプシンを用いた場合との違いを検討した。細胞膜貫通タンパクであるインテグリン β 1を蛍光染色した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞をPIPAAm固定化ガラス表面に播種し、低温処理および0.1%トリプシンによる2種類の剥離方法をTIRFMにより測定した。その結果、低温処理により方法では、接着細胞が約5分で伸展状態から球状に変化し、部分的にインテグリンを基材表面に残しながら剥離した。また、一般にインテグリンのクラスターは、細胞の伸展、移動において0.1-0.5 μ m/min程度の速度で移動することが報告されている。今回、細胞の脱着にともなうクラスターの移動は、約15秒で数 μ m移動する非常に変化の大きなものだった。一方、トリプシン処理による細胞の剥離過程では基材表面に大部分のインテグリン分子が残存する結果が観察された。これはトリプシン処理による細胞の剥離過程で、インテグリン分子が切断されたためと考えられる。以上の結果から、作製した温度応答性表面上の細胞膜タンパクの挙動精度よく測定することに成功した。

以上のように、本論文では、電子線重合法を用いてガラス表面上に温度応答性超薄膜を構築し、その表面物性が培養細胞に与える影響について詳細に検討した。また、作製した表面を用いて、細胞膜タンパクの蛍光イメージングにより、細胞剥離法の違いによる膜タンパクへの影響を評価した。TIRFMによる観察と、表面物性の評価を組み合わせることで、種々の培養細胞に合わせた温度応答性表面の精密設計に利用できると期待される。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 福守 一浩 印

(2010年3月19日現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
1. 論文 ○（報文）	1. Temperature-responsive glass coverslips with an ultra thin poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide) layer, <i>Acta Biomater.</i> , 5 , 470-476, (2009), <u>Kazuhiro Fukumori</u> , Yoshikatsu Akiyama, Jun Kobayashi, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.
○（報文）	2. Characterization of ultra-thin temperature-responsive polymer layer and its polymer thickness dependency on cell attachment/detachment properties, <i>Macromol. Biosci.</i> , in press, <u>Kazuhiro Fukumori</u> , Yoshikatsu Akiyama, Yoshikazu Kumashiro, Jun Kobayashi, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.
2. 講演	1. 温度応答性高分子薄膜ゲルの膨潤、収縮の物性評価, 第 58 回高分子討論会, 熊本, 2009 年 9 月, <u>福守一浩</u> , 秋山義勝, 熊代善一, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
	2. 原子間力顕微鏡を用いた温度応答性高分子薄膜の物性評価, 第 58 回高分子学会年次大会, 神戸, 2009 年 5 月, <u>福守一浩</u> , 熊代善一, 秋山義勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
	3. Observation of cell detachment behavior from temperature responsive polymer grafted surfaces using total internal reflection fluorescence microscopy, <i>8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers</i> , Mishima, 2009, May, <u>Kazuhiro Fukumori</u> , Yoshikatsu Akiyama, Yoshikazu Kumashiro, Jun Kobayashi, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.
	4. バイオイメーキングを指向した温度応答性ガラス表面の作製, 日本医工学治療学会 第 25 回学術大会, 大阪, 2009 年 4 月, <u>福守一浩</u> , 秋山義勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
	5. 温度応答性超薄膜ゲル表面の膜厚依存による細胞接着性の変化, 第 3 回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウム, 東京, 2009 年 3 月, <u>福守一浩</u> , 熊代善一, 秋山義勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
	6. Correlation between cell detachment kinetics and temperature-responsive polymer relaxation upon temperature reduction monitored by atomic force microscopy, <i>14th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems</i> , Salt Lake City, UT, USA, 2009, February, <u>Yoshikazu Kumashiro</u> , <u>Kazuhiro Fukumori</u> , Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
2. 講演	<p>7. Cells adhesion/detachment control onto temperature-responsive glass coverslips modified with ultra thin poly(<i>N</i>-isopropylacrylamide) layer and its application of cell detachment process observed by TIRF microscopy, <i>14th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems</i>, Salt Lake City, UT, USA, 2009, February, <u>Yoshikatsu Akiyama</u>, Kazuhiro Fukumori, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.</p> <p>8. 温度応答性高分子膜上における細胞接着性の評価, 第 57 回高分子討論会, 大阪, 2008 年 9 月, <u>熊代善一</u>, 福守一浩, 秋山義勝, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>9. 温度応答性表面の細胞接着特性と表面近傍に特化した細胞剥離挙動への応用, 第 57 回高分子討論会, 大阪, 2008 年 9 月, 福守一浩, <u>秋山義勝</u>, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>10. 温度応答性ガラス表面の作製とバイオイメージングへの応用, 第 72 回化学工学会秋季大会, 仙台, 2008 年 9 月, <u>福守一浩</u>, 秋山義勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>11. 温度応答性ガラス表面を構築した細胞培養基材の開発, 日本医工学治療学会 第 24 回学術大会, 幕張, 2008 年 4 月, <u>福守一浩</u>, 秋山義勝, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>12. 温度応答性ガラス表面を構築した細胞培養基材の開発, 第 10 回日本組織工学会, 東京, 2007 年 11 月, <u>福守一浩</u>, 秋山義勝, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>13. 温度応答性ナノグラフト層を構築したガラス表面の作製と細胞培養への応用, 第 56 回高分子学会年次大会, 京都, 2007 年 5 月, <u>福守一浩</u>, 秋山義勝, 菊地明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>14. Control of cell detachment on poly(<i>N</i>-isopropylacrylamide) grafted glass surfaces, <i>Society For Biomaterials 2007 Annual Meeting</i>, Chicago, IL , USA, 2007, April, <u>Kazuhiro Fukumori</u>, Shitaroh Iwanaga, Yoshikatsu Akiyama, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.</p> <p>15. 温度応答性ナノグラフト層を構築したガラス表面の作製と細胞培養への応用, 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会, 東京, 2006 年 11 月, <u>福守一浩</u>, 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊地明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>16. Control of cell detachment on poly(<i>N</i>-isopropylacrylamide) grafted glass surfaces, <i>2006 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, The Eleventh Symposium "Micro-NanoMechatronics fro Information-Based Society"</i>, Nagoya, Japan, 2006, November, <u>Kazuhiro Fukumori</u>, Shitaroh Iwanaga, Yoshikatsu Akiyama, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.</p> <p>17. ガラス表面での温度応答性表面の作製と TIRFM による細胞剥離観察への応用, 第 55 回高分子討論会, 富山, 2006 年 9 月, <u>福守一浩</u>, 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊地明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
2. 講演	<p>18. 温度応答性ナノグラフト層の厚みと細胞接着への影響, 第 35 回医用高分子シンポジウム, 東京, 2006 年 8 月, <u>福守一浩</u>, 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊地明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>19. 温度応答性ナノグラフト層を構築したガラス表面の作製, 第 55 回高分子学会年次大会, 名古屋, 2006 年 5 月, <u>福守一浩</u>, 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊地明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>20. 温度応答性ナノグラフト層の厚みと細胞接着への影響, 第 15 回インテリジェント材料/システムシンポジウム, 東京, 2006 年 3 月, <u>福守一浩</u>, 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊地明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>21. 温度応答性ナノグラフトゲルを構築したガラス表面の作製と細胞培養への応用, 第 54 回高分子討論会, 山形, 2005 年 9 月, <u>福守一浩</u>, 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊地明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p> <p>22. 電子線照射を用いた温度応答性ガラス表面の作製と物性評価, 第 54 回高分子学会年次大会, 横浜, 2005 年 5 月, <u>福守一浩</u>, 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊地明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.</p>